

学位論文題名

テンサイ Owen 型雄性不稔細胞質に作用する
稔性回復遺伝子の解析

学位論文内容の要旨

花粉形成の阻害をもたらす細胞質雄性不稔性(CMS)は、多くの植物種において一代雑種の採種に利用されている育種形質である。CMS の遺伝機構は花粉不稔の原因となるミトコンドリア遺伝子とその抑制に働く核コードの稔性回復遺伝子(*Rf*)との相互作用により説明される。したがって核とミトコンドリアの相互作用の機構を調査する上でも興味深い形質と言ってよい。

テンサイは CMS の遺伝、育種学的研究が活発に行われてきた植物の一つであり、最近では他の植物に先駆けて正常型および Owen CMS 型ミトコンドリアゲノムの全塩基配列が決定された。また、雄性不稔性発現との関連が強く示唆されるポリペプチドとそれをコードするミトコンドリア遺伝子 *preSatp6* の同定も完了した。しかしながら稔性回復遺伝子に関する知見は乏しい。Owen 型不稔細胞質の稔性回復には 2 個の補足遺伝子(*RfX* および *RfZ*)が働くという仮説が提起されたが、この仮説と矛盾するデータが得られる場合も少なくない。

Rf 遺伝子の解析は CMS の分子機構の解明に不可欠である。また、*Rf* が同定されるならば、検定交配に依拠する CMS 維持花粉親(*r*)をホモ接合型で持つ個体)選抜の効率化が実現するため、その育種の貢献は大きい。本研究では *Rf* のポジショナルクローニングを目的に実験を進め、*Rf* の分子マーカーによる標識、*Rf* 座周辺における物理地図の作成、ならびに *Rf* 候補遺伝子の選抜を行った。

1 稔性回復遺伝子に連鎖するマーカーの同定および遺伝分析

CMS 系統を母体とし、*Rf* を保持する稔性回復系統「NK198」の花粉を交配して育成した後代を 4 集団準備した。これらを用いて *Rf* 遺伝子座近傍の連鎖地図を作成すると共に、得られた分子マーカーを適用して稔性回復性の遺伝仮説を検証した。

まず、稔性回復性に連鎖する RAPD マーカーおよび AFLP マーカーを設定した。814 種のプライマーを用いた RAPD 分析の結果、稔性回復性と連鎖する 2 種のマーカーを同定した。より近接するマーカーを得るため更に 2,721 種のプライマー組合せにおいて AFLP 分析を行い、稔性回復性と密接に連鎖する 8 種のマーカーを得た。これらのマーカーを用いて連鎖地図を作成した。得られた分子マーカーは同一連鎖群に帰属し、*RfX* を標識することが明らかとなった。*RfX* 座は 3.4cM の範囲に限定され、*RfX* と共分離を示すマーカーも複数得ることができた。

標識された *RfX* の分離と雄性不稔型の分離に基づいて、「NK198」による稔性回復の遺伝様式について検討を加えた。本研究に用いた 4 集団の何れにおいても、稔性回復の遺伝様式は相加的に働く 2 遺伝子を想定する既往の仮説では説明できなかった。そこで、Owen 型不稔細胞質に働き稔性回復をもたらす *RfX* と、*RfX* に対して相互作用を示し稔性の向上もしくは低下を促す変更遺伝子(群)が分離していると仮定することにより観察結果を説明した。

2 BAC ライブラリーの構築および *RfX* 座の物理地図

テンサイの *Rf* 単離に利用可能なゲノムライブラリーはこれまでに報告されていない。そこで、稔性回復遺伝子を有する系統「NK198」を材料に BAC ライブラリーを構築した。総数 32,180 クローンからなる本ライブラリーの平均インサート長は 97.8kb であり、テンサイ核ゲノムサイズ(758Mb)の約 3.4 倍に相当する。作製したライブラリー中から *RfX* 座周辺に位置するマーカーを含む BAC クローンを選抜し、クロモソームウォーキングを行うことで約 800kb に亘る一連のコンティグを完成した。*RfX* を挟む AFLP マーカー間の物理距離は約 600kb と推定される。

RfX を含む領域を更に限定するため、BAC コンティグから CAPS マーカーおよび PCR マーカーを作出した。これらの新規マーカーを利用し、遺伝学的手法により *RfX* 座の絞り込みを図った。雄性不稔型の分離をみる戻し交配集団の 509 個体から *RfX* 近傍で遺伝的組換えを生じた 13 個体を選抜し、マーカーの遺伝子型を判別することによって、*RfX* 座乗域を約 300kb 領域に限定することができた。

3 *RfX* 座乗域に見出された発現領域

RfX が座乗する 300kb 領域には 30 個の ORF が見出された。これらの ORF のうちレトロエレメントとの高い相同性を有する ORF を除いた 28 個の ORF を対象に RT-PCR を行った。その結果、*Rf* を有する稔性回復系統「NK198」の花芽において発現が見られる 18 個の ORF を特定した。これらの ORF は何れも *rfx* をホモ接合型で持つ系統の花芽においても、転写されていることが判った。

見出された発現領域のうち、ペチュニアやコセナダイコンで単離された *Rf* が有する PPR(pentatricopeptide repeat)モチーフを含む ORF7、およびミトコンドリア局在が予想された 5 個の ORF について特徴付けを進めた。クローン化した cDNA の構造から推定されるアミノ酸配列を基に細胞内局在予測を行った結果、ORF6(機能未同定タンパク質との相同性を示す)および 4 種のメタロプロテアーゼ様配列 (ORF10,12,15,17)においてミトコンドリア移行が予測された。一方、PPR ファミリーに属する ORF7 に関しては葉緑体遺伝子の発現制御に働くトウモロコシ CRP1 と最も高い相同性を有し、有意な細胞内局在性は予測されなかった。これらの ORF の転写には器官特異性はみられず、何れも葯において転写産物の蓄積が確認された。また、サザンブロット実験によりメタロプロテアーゼ様配列のコピー数には明瞭な系統間多型が検出され、4 コピー存在する「NK198」に比して *rfxfx* 系統ではコピー数が減じていることが明らかになった。

以上のように PPR ファミリーに属する ORF7 と *RfX* との関連は特に認められなかった。また、トウモロコシ *Rf2* がコードするアルデヒドデヒドロゲナーゼやその代謝経路に関連する遺伝子は *RfX* 座乗域に存在しない。よって、*RfX* はこれまでに報告例のない新規の *Rf* である可能性が高い。系統間多型が見出されたメタロプロテアーゼ様配列と *RfX* との関連が注目される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 上 哲 夫
副 査 教 授 喜 多 村 啓 介
副 査 教 授 佐 野 芳 雄
副 査 講 師 久 保 友 彦

学 位 論 文 題 名

テンサイ Owen 型雄性不稔細胞質に作用する 稔性回復遺伝子の解析

本論文は 87 頁からなる和文論文であり、図 26 と表 22 を含む。別に、参考論文 3 編が添えられている。

テンサイは小型の両性花をつける。テンサイのハイブリッド品種を育種する際には、種子親の雄蕊を取り除かなければならない。ただ花のサイズが小さいので、機械的な除雄は不可能である。そのため細胞質雄性不稔を利用し花粉を作れない種子親を準備した上で、ハイブリッド採種が行われてきた。

テンサイの細胞質雄性不稔に関しては 2 個の補足遺伝子 *RfX*、*RfZ* が、ミトコンドリアに含まれる雄性不稔原因遺伝子の作用を抑制して、花粉稔性回復に働くという仮説が提起されている。しかし、*Rf* 遺伝子の実体は明らかでない。*Rf* 遺伝子の研究は雄性不稔の機構解明に重要であるのみならず、効率的な雄性不稔維持花粉親 (*rf* を劣性ホモ接合型でもつ個体) 選抜法の開発につながり、育種的貢献も大きいと期待される。本研究では、主に分子的手法を用いて、*Rf* を解析した。得られた結果は以下のように要約される。

1. 稔性回復遺伝子に連鎖する DNA マーカーの同定

雄性不稔分離集団を供試して、稔性回復性と連鎖する分子マーカーを設定した。814 種のプライマーを用いた RAPD 分析の結果、2 種の連鎖マーカーを同定した。より近接するマーカーを得るため更に 2,721 種のプライマー組合せにおいて AFLP 分析を行い、稔性回復性と密接に連鎖する 8 種のマーカーを得た。得られた分子マーカーは同一連鎖群に帰属し、*RfX* を標識することが明らかとなった。*RfX* 座

は 3.4cM の範囲に限定され、*RfX* と共分離を示す複数のマーカーも得ることができた。

2. BAC ライブラリーの構築および *RfX* 座の物理地図

テンサイの *Rf* 単離に利用可能なゲノムライブラリーはこれまでに報告されていない。そこで、稔性回復遺伝子を有する系統「NK198」を材料に BAC ライブラリーを構築した。総数 32,180 クローンからなるライブラリーの平均インサート長は 97.8kb であり、テンサイ核ゲノムサイズ (758Mb) の約 3.4 倍に相当する。

このライブラリーより *RfX* の連鎖マーカーを含むクローンを選び、クロモソームウォーキングを行って 800kb に亘るコンティグを作った。続いて、雄性不稔型の分離をみる戻し交配集団の 509 個体から、*RfX* 近傍で遺伝的組換えを生じた 13 個体を選抜し、分子マーカーの遺伝子型を判別した。その結果、*RfX* 座乗域を 300kb 領域に限定できた。

3. *RfX* 座領域の遺伝子発現

RfX 座を含む 300kb 領域には 30 個の ORF (タンパク質読み取り枠) がみつかった。*Rf* 遺伝子は葯で発現するとともに、ミトコンドリアへの移行シグナルをもつはずである。300kb 領域には、これらの条件を備えた ORF が 5 個含まれている。最近、ペチュニアやダイコンでクローン化された *Rf* はいずれも PPR (pentatricopeptide repeat) モチーフを有するが、今回テンサイで見出した *Rf* 候補 ORF にはこのような構造的特徴はみられない。一方、興味深いことに、4 個のテンサイ ORF のコードタンパク質はタンパク質の品質管理等に働くメタロプロテアーゼとの相同性を示しており、テンサイの *RfX* はこれまでに報告例のない新規の *Rf* である可能性が高い。

本研究の成果はテンサイの細胞質雄性不稔性の機構解明と育種技術の開発に寄与するところが大きく、学術および応用の両面で高く評価できる。

よって審査員一同は萩原栄揮が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。